

200501150 B 1/2

厚生労働省科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

プライマリーヒト細胞を用いた化学物質曝露・

遺伝子発現に関する研究(H15-化学-001)

平成15年度～17年度 総合研究報告書

主任研究者 藤村 昭夫

平成 18(2006)年 4 月

## 目 次

### I. 総合研究報告

プライマリーヒト細胞を用いた化学物質曝露・遺伝子発現に関する研究\_\_\_\_\_ 1

藤村昭夫

別紙1 遺伝子解析研究倫理審査委員会設置規程\_\_\_\_\_ 19

別紙2 遺伝子解析研究倫理審査提出研究計画書・患者説明文書・同意書\_\_\_\_\_ 22

別紙3 遺伝子解析研究倫理審査提出研究計画書・患者説明文書・同意書\_\_\_\_\_ 37

別紙4 ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する取扱規程\_\_\_\_\_ 58

II. 研究成果の刊行に関する一覧表\_\_\_\_\_ 75

III. 研究成果の刊行物・別刷\_\_\_\_\_ 添付

主任研究者 藤村昭夫 自治医科大学臨床薬理学

## 研究要旨

本研究は、プライマリーヒト細胞を化学物質に曝露させた際の遺伝子発現プロファイルを DNA マイクロアレイを用いて網羅的に明らかにし、それに基づいて化学物質の安全性を、従来の毒性実験よりも正確かつ詳細に予測する新しい毒性評価法を確立するために有用な遺伝子発現情報データベース構築を目的とする。Affymetrix 社の DNA チップである GeneChip®を用いたデータ解析は、多くの発現データを産生するため、そのデータの解釈には従来の研究手法にはない手順が必要となる。そのデータが膨大であるため、曝露実験発現解析を行った研究者自身がすべてのデータを様々な角度から検証・確認を行った後に意味づけを行い、データを解釈することは困難である。そのため、得られたデータを、データベースとして公開し多くの研究者にデータを解釈する機会を提供することが重要と考えられる。従って、データの信頼性を担保することが重要である。本研究ではまず第一に、我々の行っている曝露研究の発現データの信頼性を示した。

ノーマライゼーションはマイクロアレイを応用した発現解析のはじめの段階に行われる重要なプロセスである。そこで本研究の第二番目の課題として様々なノーマライゼーションの方法の特徴とそれぞれの前提となる仮定の検証を行った。

ヒトの遺伝子配列には個人差が存在することが知られているが、ヒト組織を対象とした、発現情報の個人差を直接示した報告はこれまで見られない。本研究の第三番目の課題として、プライマリーヒト腎細胞における遺伝子発現の個人差を評価することとした。化学物質未曝露の腎臓由来細胞の RNA を 11 症例分を用いて GeneChip を用いた遺伝子発現解析を行った。

本研究の第五番目の課題として、本研究の中心的な研究テーマである、化学物質曝露後の遺伝子発現解析を行った。22 種類の化学物質について、約 39,000 個の転写産物の発現情報を得て、18 種類の化学物質曝露後の発現データについてデータベース化した。

第六番目のテーマとして、本データベースの応用例を示す。環境に存在し問題となっているヒ素化合物に焦点を絞り、発現をさらに詳細に観察し、細胞毒性メカニズムへアプローチした。データベースを解析すると、arsenic trioxide によって HMOX1 の発現が誘導されていた。この現象は日本人プライマリー腎細胞のみならずヒト胎児腎細胞由来 HEK293 細胞株においても確認され、さらに蛋白質レベルでもその発現誘導が確認された。また、HMOX1 の発現を誘導することにより arsenic trioxide による細胞毒性が軽減できた。HMOX1 の機能より arsenic trioxide の殺細胞活性が酸化ストレスであると推測し、arsenic trioxide による活性酸素の生成を検討したところ、細胞が存在する系において arsenic trioxide は活性酸素の発生を誘導していることが明らかとなった。

第七番目のテーマとして、データベースの一部を個別に見るのではなく、全体として解析する手法について検討した。化学物質を便宜的に 4 つに分類しその発現データを基に、有意に変化する遺伝子をリスト化した。10 分、1、6、24 時間後の比較として経時的変化を観察したところでは、24 時間後に発現量変化を来す遺伝子の数が多かった。今後の *in vitro* 曝露研究に於いて、経時変化情報が重要でない場合には 24 時間の曝露が好ましいと考えられた。こうした、各カテゴリー内で共通して変動する遺伝子は、そのカテゴリーの細胞毒性において普遍のメカニズムを示唆する可能性がある。また、このように共通して変動する遺伝子の上流配列（転写因子結合配列）を探索するアプリケーションを開発した。

### A. 研究目的

本研究は、プライマリーヒト細胞を化学物質に曝露させた際の遺伝子発現プロファイルを DNA マイクロアレイを用いて網羅的に明らかにし、それに基づいて化学物質の安全性を、従来の毒性実験よりも正確かつ詳細に予測する新しい毒性評価法を確立するために有用な遺伝子発現情報データベース構築を目的とする。化学物質の安全性研究は動物を用いて主に血液生化学および形態学のレベルで解析され

てきた。しかし、多くの化学物質の中で実験動物では何ら有害反応を示さなかったが、日常生活で使用中にヒトに重篤な有害反応を来し、使用が中止されるものがある。さらに稀ではあるが身体に不可逆的な障害をもたらす、社会問題化することもある。したがって、この様な化学物質を早期に検出し、より高い安全性を確保するために、ヒトを対象とした何らかの科学的解決法が求められている。腎は生命維持のための重要臓器であるが、しばしば有害化学物質のターゲットとなる。また、基礎研究でしばし

ば用いられる継代培養細胞の多くはガン化しており、遺伝子発現が正常細胞と異なることがある。そこで本研究ではプライマリーヒト腎細胞に腎障害性化学物質を曝露させ、DNA マイクロアレーによる網羅的遺伝子発現プロファイリングを行なう。さらに得られたデータを基にして、化学物質の安全性を早期に予測するためにバイオインフォマティクスを応用してデータベースを構築する。この様な化学物質に関するデータベースを応用することにより、新規(および既存)の化学物質に関して 1) 腎障害性のポテンシャルは高いか低いのか 2) 既存のどの腎障害性化学物質に類似しているのか 3) どの遺伝子群が障害に寄与しているのか、について判断する基礎となる研究を推進することが可能と考えられる。我国における有害化学物質に対するリスクマネジメントの質の向上に大きく貢献するものと考えられる。

## B. 研究方法

### B-1. RNA 及びデータの質の評価

腎臓尿細管由来の細胞は、形態・Glut 2 発現・ $\gamma$  GTP 発現で評価する。腎臓尿細管由来細胞は上皮由来細胞であり紡錘形の形態を示し、培養フラスコへ接着して増殖することが期待される。また、尿細管由来であれば、Glut2 および $\gamma$  GTP を発現していることが期待される。Glut2 はフローサイトメトリを応用して抗原性の存在として、 $\gamma$  GTP 基質を発色性の代謝産物へ変換しその発色を確認する酵素活性を確認した。RNA の質の信頼性については、サンプル群の Percent Present 及びハウスキーピング遺伝子 (GAPDH およびアクチン (HSA)) の 3'/5' 比で評価した。Percent Present に関しては、一定の評価基準はないものの、今回我々が行った様に均一なサンプルの化学物質曝露研究では同一のチップにおいて大きな変動を示さないことが好ましいと考えられている。また、ハウスキーピング遺伝子の 3'/5' 比は我々の使用しているラベリング方法では、理想的には 1.0 前後となることが期待され、3.0 以下である場合が解析に適していると判断することが一般的である。

### B-2. ノーマライゼーション

当研究部で行っている解析プロトコールである。GeneChip システムでは4万を超えるトランスクリプトが一度に測定されるため、データハンドリングには通常の生物学的な統計的手法とは異なるテクニックが必要である。多くの測定された遺伝子は発現していない、あるいは有意な変化を来していないものと推定される。こうした前提でデータから有意な変化を来す遺伝子発現データを抽出するためにこのような手順を踏んでいる。ノーマライゼーション・ノイズ除去・時間経過を軸とした発現量変化のクラスタリングを行った。ノーマライゼーションには、主に3つの方法がある。すなわちグローバル法・陽

性コントロール法・RNA 以外の細胞成分を基準としたスパイキングである。グローバルノーマライゼーションの前提となっている細胞あたりの全 RNA 量を直接比較することは困難であるために、このパラメータと相関が深いと考えられる percent present を用い、プラットフォームごとに比較した。陽性コントロールを用いる方法は、その陽性コントロール自体が一定の発現量であるか否かを直接検証することは困難である。古典的な研究においてしばしばコントロールとして使用されるハウスキーピングジーンは細胞骨格の量に関連しているため、本研究では細胞サイズを FACS 等を用いて検討した。最後に RNA 以外の細胞成分で、基準とされることの多い染色体 DNA 含量が化学物質曝露によって変化するか否かを検討した。

### B-3. 日本人プライマリーカルチャーの遺伝子発現における個体差

これまで 11 人分の患者由来の細胞をプライマリーカルチャーにすることができた。薬物曝露刺激などを行わずに、培養していた基礎的な遺伝子発現を解析した。11 人分の細胞をそれぞれ 3 回に分けて培養し、遺伝子発現解析を行った。結果的に 9 人分のサンプルが解析対象として我々の基準に適合し、評価の対象となった。2 人分の細胞は、凍結保存後の発育が不良で、良質な RNA が得られなかったため、解析対象として適していないことが解った。

### B-4. 化学物質曝露遺伝子発現実験

曝露した化学物質は Cadmium Chloride (0.1 mc mole/L), Lead Acetate (10 mc mole/L), Thimerosal (Mercury, 50 n mole/L), As2O3 (Arsenite trioxide, 0.1 mc mole/L), 2,3,7,8-TCDD (10 n mole/L), ethanol (1% v/v), Dimethyl sulfoxide (1% v/v), H3AsO4 (1.0 mcM), AsI3 (0.05 mcM), ortho-arsanilic acid (10 mcM), cacodylic acid (10mcM), allyl alcohol (100 mcM), ethylene glycol (100 mcM), chloroform (10 mcM), phenol (100 mcM), formaldehyde (0.1 mcM), alpha-hexachlorocyclohexane (1 mcM), beta-hexachlorocyclohexane (1 mcM), gamma-hexachlorocyclohexane (1 mcM), delta-hexachlorocyclohexane (1 mcM), Sodium Selenite (Na2SeO3-5H2O 65.8 nM), RPMI-CM (vehicle として) を含めて遺伝子発現解析を行った。時間経過を含めた、データポイントの解析上のユニークアイデンティファイヤーを表 1、表 2 に示す(別紙参照)。

### B-5. ヒ素化合物の細胞毒性メカニズム

arsenic trioxide の発現実験により得られたデータは、k-means クラスタリングを行い、5つのクラスターへ遺伝子を分類した。この中より遺伝子発現が経時的に上昇する傾向にある HMOX1 遺伝子につき、その発現を定量 PCR を行い確認した。蛋白質レベルでの発現誘導の有無をウエスタンブロットにより確認した。また、HEK293 細胞において HMOX1 遺伝子を CMV プロモーター下に発現させた細胞を作成し、arsenic trioxide による殺細胞活性を、発現誘導していない細胞株と比較した。

arsenic trioxide 曝露により酸化ストレスと関連した HMOX1 遺伝子が誘導されたため、arsenic trioxide の細胞毒性と酸化ストレスの関連を検討した。1 μM MCLA を arsenic trioxide 曝露有無で、培養上清へ添加し、その蛍光を IVIS (Xenogen 社) で測定した。

### B-6. データベースの全体像

今回各分類ごとにデータを扱ったが、分類した具体的な内容を表 3 (解析分類表、別紙参照) へ示す。

解析は主にボルケーノプロットにより行った。ボルケーノプロットを行うにあたり、解析ソフト

(GeneSpring) へ与えたパラメータを各分類ごとに表 4-表 7 へ示す (別紙参照)。

### B-7. 転写因子検索ソフト

遺伝子発現の変化は、その遺伝子の転写を制御している転写因子の活性が反映されている場合が少なくない。これら遺伝子発現変化をもたらしている主要な転写因子が何であるかを推測する上で、それぞれの遺伝子上流の転写因子結合配列を検索することが必要となる。しかし、こうした上流配列を検索するために適したツールはこれまで公開されていなかったため、我々の分担研究の一つとして上流配列を検索するソフトウェアを開発した。これは、既知の 5,000 にもおよぶ転写因子結合配列をデータベースとして保有する一方、ヒトゲノムデータ build 34 の遺伝子データを元に、遺伝子上流に転写因子結合配列が存在するかどうかを網羅的に検索する機能も有する。

(倫理面への配慮)

本研究に用いた細胞はすべて、樹立された細胞株または当大学の倫理評価 WG が承認した方法で得た臨床検体のいずれかである。詳細を記載した研究の倫理申請書類・研究の承認を証明する書類を添付する。

## C. 研究結果

### C-1. RNA 及びデータの質の評価

純化したプライマリーヒト腎細胞をヘマトキシリン・エオジン染色し、顕微鏡下に観察したところ紡錘形の上皮由来組織の細胞形態として矛盾がなかった。

γ GTP 染色を行ったところ陽性であり、フローサイトメトリーにより Glut2 の発現も確認できた。今回データベースとしてまとめた発現解析結果の percent present の分布を図 1 に示す。HG-U133A および HG-U133B それぞれの percent present 値は大きく変動せず。今回のような同一組織への曝露研究であれば、あまり変動しないことが期待されるが、その通りの結果であった。(図 1)

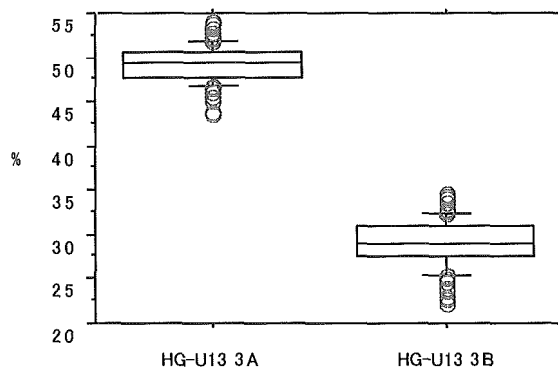


図 1. 本プロジェクトの%Present の分布

3' / 5' 比は 3 以下であれば発現研究の対象として望ましいが、本プロジェクトのデータ (図 2) では全ての GeneChip において 3' / 5' 比は 3 以下であった。

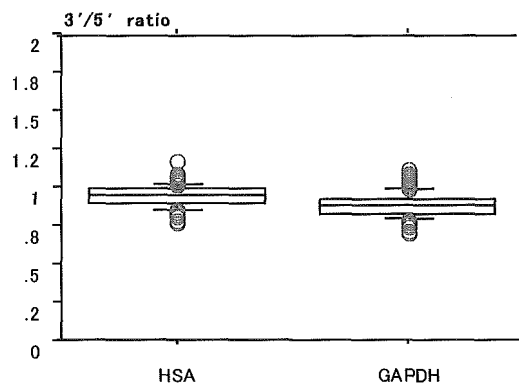


図 2. HAS(actin) GAPDH の 3' / 5' 比の分布

### C-2. ノーマライゼーション

化学物質曝露研究ではそれぞれのノーマライゼーションの前提が成立しやすいのか、あるいは変動しやすいのか、ダイレクトに検証することは容易ではない。

#### グローバルノーマライゼーションの前提の評価

内部グローバルノーマライゼーションでは、全 mRNA 量が化学物質曝露によりほとんど変化しないことを前提に解析

を行う。これを間接的に確認する方法として、本研究では Percent Present という値を採用した。

Affymetrix 社の GeneChip で解析した発現データには Abs Call という値がそれぞれのトランスクリプトに対応して与えられる。Percent Present 値は全トランスクリプトあたりの Present と Call されたトランスクリプトの割合で定義される。多くの遺伝子発現が変化しなければ Percent Present は余り変化しない。一方、Percent Present のバリエーションが大きい時は、多くの遺伝子発現が変化していると考えられる。

図3で示した projectA は他のプロジェクトに比較して、この Percent Present 値のバリエーションが非常に大きく、多くの遺伝子発現が変化しているものと考えられた。一方、projectD では 90% のデータが 5% 以内の変動であり、projectA よりは遺伝子発現の全体的変化は少ない。この図からは、projectA は明らかに内部グローバルバリエーションに不向きであると推測できる。

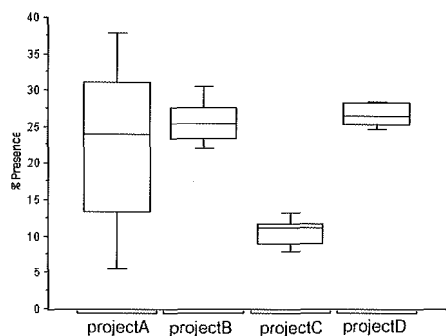


図3. プラットフォームごとの%Present

ボックスプロットで表示されている中央のラインが中央値で、箱の上下バーの範囲に 60% のデータが、ひげの上下の範囲に 90% のデータが分布している。ProjectA のように %Present が大きく変動するような遺伝子発現研究では、多くの遺伝子の発現が変動していると考えられるため、グローバルノーマライゼーションは好ましくないと考えられる。比較のため、本研究のみならず過去のプロジェクトを含めて解析を行った。

#### 染色体 DNA 含量を基準としたノーマライゼーションの前提の評価

染色体 DNA 含量を基準としたノーマライゼーションは、単純な仮説に基づく。すなわち、細胞あたりの染色体 DNA は一定・不変であるという前提である。細胞一個あたりの DNA 含量の定量は、細胞周期の研究と深く関わりがあり、ほぼ直接的な評価方法が確立している。細胞あたりの DNA 含有量をプロピディウムイオダイド染色を用いたフローサイトメトリーによって検討した。定常状態の機能細胞は G0 期の

2N に相当する DNA を有すると考えられるが、シトシンアラビノシドやノコダゾールなどの化学物質曝露によって、細胞あたりの DNA コンテンツが大きく変動することが明らかとなった。このような化学物質の場合にはゲノム DNA の量が増減するかどうかの検討が必要である。また、ヒト正常肝細胞・巨核球については薬物曝露なしでポリプロイディが知られているため、染色体 DNA 含量を基準としたノーマライゼーションは好ましくない場合があると考えられる。

#### ハウスキーピングジーン発現量を基準としたノーマライゼーションの前提の評価

ノザンプロットや RTPCR などの古典的研究手法を用いて遺伝子発現を 2 つ以上の実験条件で比較する場合、しばしば、アクチンや GAPDH などの細胞骨格と関わり深い遺伝子発現量を基準とすることがある。これらの遺伝子発現量が常に一定であると担保する研究結果はないものの、多くの場合これらが基準として広く用いられている。本研究では細胞骨格が細胞の大きさと深い関わり合いのあることに注目し、細胞のサイズと化学物質曝露の関連を評価した。図4に示すように細胞のサイズが化学物質濃度と関連して大きくなる細胞集団と小さくなる細胞集団が存在する。このような場合に、細胞骨格を形成するハウスキーピングジーン発現量は変化している可能性がある。

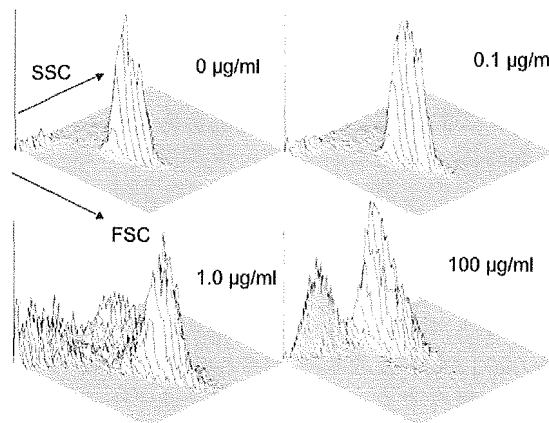


図4. HL-60 細胞に対し、Nedaplatin 曝露後 72 時間のホワード及びサイドスカッチャー

細胞のサイズと相関の高いホワードスカッチャーおよび細胞の光学的な複雑さと相関が高いとされているサイドスカッチャーの 2 つのパラメータを平面軸にした、3D ヒストグラムである。4 つのパネルは全て同じスケールで表示している。

それぞれのノーマライゼーションを評価するための明確な基準はないが、それぞれの方法で中央値が一致するようにノーマライゼーションを行った場合の最頻値の変動を観察したところでは、グローバルノーマライゼーションが最もばらつきが大きくなるこ

とが観察された。

### C-3. 日本人プライマリーカルチャーの遺伝子発現における個体差

各個人ごとの平均と分散を遺伝子ごとに計算して、t-test p 値 0.01 を有意水準として検定したところ、約 44,000 トランスクリプト中 63 のトランスクリプトについて有意に個人間で発現量が異なると判定された。

### C-4. 化学物質曝露遺伝子発現実験

プライマリーヒト細胞を用いた曝露実験に先立ち、化学物質の細胞毒性を明らかとするために WST1 アッセイにより、細胞毒性が見られる濃度を検討した。一例としてヒ素化合物の濃度決定時に行った結果を示す (図 5)

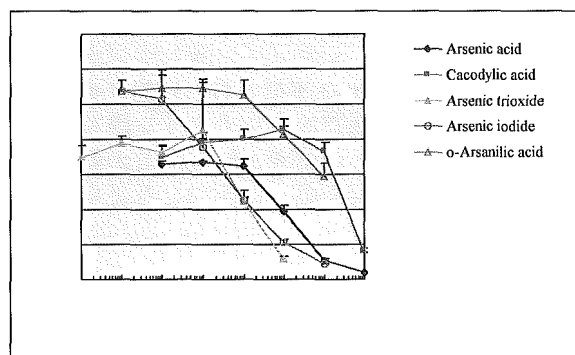


図 5. 曝露濃度および WST1 アッセイ (相対吸光度)

この検討により IC50 の概算を算出し、その百分の一の濃度を遺伝子発現曝露実験に応用する曝露濃度とした。IC50 値の濃度で曝露すると、多くの細胞が細胞障害を起こしており良質の RNA が得られないため発現解析に適切なデータが得られにくい点と、過去の検討により比較的低い濃度でもやや高濃度と類似の遺伝子発現パターンが得られるケースが多いことが明らかになっているため、IC50 の百分の一の濃度を曝露濃度とした。結果として図 5 のアッセイにより決定した濃度は、

砒化ヒ素	: 0.05 mcM
ヒ酸	: 1 mcM
カゾル酸	: 10 mcM
o-アサンル酸	: 10 mcM

である。その他の化合物については同様のアッセイにより、方法のパラグラフに記載したとおりの濃度とした。

### C-5. ヒ素化合物の細胞毒性メカニズム

遺伝子発現情報を k-means クラスタ法により分類したところ、図 6 の通り、5 つの遺伝子群に分類することができた。

### 三酸化ヒ素曝露試験遺伝子発現解析

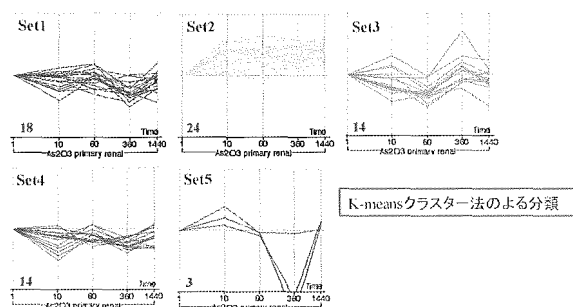


図 6. K-means 法による分類

それぞれのクラスターへ分類された遺伝子は以下の通りである (表 8-表 12 別紙参照)。

これらについて定量 PCR により、その発現を比較した。set2 に含まれる HMOX1 は定量 PCR により発現変化が確認された。経時的に上昇傾向がある点・曝露濃度依存性に発現量が上昇する点なども確認できた。また、HMOX1 遺伝子を強制発現することにより arsenic trioxid の細胞障害性を抑制できることが明らかとなった。

ヒ素化合物を培養メディアウムへ加えることによりスーパーオキシドアニオンに代表される活性酸素種が発生することを確認した。また活性酸素種は細胞障害性を示した。細胞障害性が活性酸素種の抑制剤により抑制された点より、ヒ素化合物の毒性の少なくとも一部は活性酸素種の発生によるものと結論づけた。

### C-6. データベースの全体像

発現データを方法のセクションに記載した条件で解析し、有意に変化したと判断された遺伝子の数を表 13 に記載する (別紙参照)。

この発現変化を来した遺伝子数 (発現増加及び減少両方の総数) を 3 次元表示した (図 7)

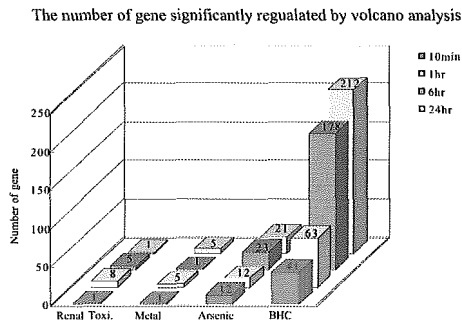


図 7. 発現変化を来した遺伝子数

多くの化合物において、24時間目の発現量変化が有意であった遺伝子数が多かった。

Renal toxicity グループとした化合物により有意に発現量変化を来した遺伝子リストを次に示す(表 14, 別紙参照)。

Metal group として化合物により有意に発現量変化を来した遺伝子リストを次に示す(表 15, 別紙参照)。

Arsenic compound group として化合物により 10 分後、1 時間後に有意に発現量増加を来した遺伝子リストを次に示す(表 16, 別紙参照)。

Arsenic compound group として化合物により 6 時間後に有意に発現量増加を来した遺伝子リストを次に示す(表 17, 別紙参照)。

Arsenic compound group として化合物により 24 時間後に有意に発現量増加を来した遺伝子リストを次に示す(表 18, 別紙参照)。

Arsenic compound group として化合物により 6, 24 時間後に有意に発現量低下を来した遺伝子リストを次に示す(表 19, 別紙参照)。

hexachlorocyclohexane group として化合物により 24 時間後に有意に発現量変化を来した遺伝子の機能分類を行い、その機能ごとに発現量変化を来した遺伝子数を次に示す(表 20, 別紙参照)。

## B-7. 転写因子検索ソフト

遺伝子発現の変化は、その遺伝子の転写を制御している転写因子の活性が反映されている場合が少なくない。これら遺伝子発現変化をもたらしている主要な転写因子が何であるかを推測する上で、それぞれの遺伝子の upstream の転写因子結合配列を検索することが必要となる。しかし、こうした upstream 配列を検索するために適したツールは我々が研究を開始した当初は公開されていなかったため、我々の分担研究の一つとして upstream 配列を検索するソフトウェアを開発した。

2,3,7,8-TCDD と All-trans retinoic acid, 9-cis retinoic acid の経時的発現変化を比較したところ、有意なクラスターが 39 種類(1309 トランスクリプト)認められた。このトランスクリプトの中の 1 種類の遺伝子 CSNK2A2 (casein kinase2)につき、定量 PCR と GeneChip の発現量に相関が認められた。この転写因子検索ソフトを活用して CSNK2A2 遺伝子の upstream を検索したところ、レチノイン酸レセプター結合配列である RARE motif が観察され、レチノイン酸曝露による遺伝子発現制御が、レチノイン酸レセプターと関連していることが示唆された。この転写因子検索ソフト及び発現実験が、合理的と考えられる結果を導き出した。

## D. 考察

### D-1. RNA 及びデータの質の評価

腎臓摘出手術を受けた患者より得た非病変部の腎皮質組織よりプライマリーカルチャーを作成した。得られた細胞の多くは尿細管由来として矛盾がなかった。これらの細胞へ化学物質を曝露し遺伝子発現解析を行った。RNA の質を様々な方法で評価したところ得られたチップのデータは一定の質を有しており、評価に値すると考えられる。

### D-2. ノーマライゼーション

重要な解析手順であるにもかかわらず、ノーマライゼーションの方法については、単一のベストな方法があるとは言えない。それぞれの特徴を考慮した上で、目的に即した方法を選択する必要がある。本研究では、これまで主に利用されている 3 つの方法について、その前提となる仮定が崩れる場合のあることを明らかとした。グローバルノーマライゼーションでは、細胞あたりの全メッセンジャーRNA量はほぼ一定で、化学物質曝露刺激に対応して変化する遺伝子はごく一部であろうという前提でノーマライゼーションを行う手法である。percent present を評価することにより、グローバルノーマライゼーションを明らかに適用すべきでない判断できる場合があった。また、我々の試した範囲では、最も結果のばらつきが顕著であった。また、RNA 以外の細胞成分が一定であることを前提としたノーマライゼーションについても、DNA の量を変化させる化学物質が



存在することが明らかとなり、必ずしも絶対的に信頼できる指標とは言えないことが明らかとなった。さらに、陽性コントロール遺伝子を利用した方法でも、多くの場合に利用されているハウスキーピング遺伝子と関連の深い細胞骨格量を指標とした FSC 値も、化学物質曝露により変動することが明らかとなった。個別の遺伝子発現研究に於いて、それぞれの方法でノーマライゼーションを行うべきかを検討することが好ましいと考えられる。

### D-3. 日本人プライマリーカルチャーの遺伝子発現における個体差

各個人ごとの平均と分散を遺伝子ごとに計算して日本人プライマリーカルチャーの遺伝子発現の個体差を検討した。発現データは培養条件などに鋭敏に反応することが考えられ、生体内で示していた遺伝子発現情報をどこまで反映しているかは明らかでない。しかし、同様の条件で処理・培養された細胞が個体差を示したことは過去に報告されていない。より詳細な記述を現在投稿中である。

### D-4. 化学物質曝露遺伝子発現実験

18 種類の化学物質曝露後の経時的遺伝子発現データを、データベース化した。日本人プライマリーカルチャーへ化学物質曝露を行った後のこうした体系的発現解析は過去に報告が無い。さまざまな応用例が期待される。また今後このデータベースの拡張が望まれる。本データベースは今後公開する予定である。

### D-5. ヒ素化合物の細胞毒性メカニズム

化学物質曝露遺伝子発現研究を行った。(表 1. 表 2) 発現データは膨大であり、そのまま情報を知識として理解することは困難である。なんらかの視点をもって解析を進める必要がある。

まずはじめに腎細胞障害性を IC50 で検討し、腎障害ある化学物質と細胞障害の見られない化学物質の曝露後の遺伝子発現情報について比較した。細胞障害性を有する様々なカテゴリーからなる化合物において共通して有意に発現変化を来す遺伝子(トランスクリプト)を見いだすことはできなかった。腎細胞障害のメカニズムが様々であり、様々なカテゴリーからなる化合物曝露に反応して共通して発現変化を来す遺伝子がなかったと考えられる。

次に、一つの化合物・カテゴリー(ヒ素化合物)に注目し、ヒトプライマリー腎細胞・ヒト胎児腎由来細胞株に共通して変化する遺伝子を探索した。その結果 k-means 方により 5 つのクラスターに分類することができた。(図 6) ここで得られた遺伝子リスト(表 8-12)について、機能・発現を検討して、さらに HMOX1 に注目した。この遺伝子は酸化ストレスにより発現が誘導されることが知られており、ヒト腎細胞におけるヒ素の細胞毒性が酸化ストレスでは

ないかという仮説に従い、これを検証することとした。

ヒ素化合物を培養上性へ加えることにより、活性酸素種特異的な指示薬 MCLA が蛍光を発することを確認した。また、活性酸素種が腎細胞株に毒性を示したことから、今回使用したヒ素化合物の細胞毒性には、ヒ素曝露により生化学的なメカニズムで発生した活性酸素種が関連していると結論づけた。

### D-6. データベースの全体像

毒性メカニズムが様々であるために、細胞毒性の有無を的確に予測する遺伝子を見いだすことはできなかったが、類似のカテゴリーの化学物質内においては、類似の発現変化を来すのではないかという仮説を検討した。カテゴリー分けは表 3 の通りである。腎細胞障害有り・無しのカテゴリーでは有意に変化した遺伝子が全く認められなかったのに対し、カテゴリー分けに関しては表 13・図 7 の通り複数の遺伝子発現変化を観察することができた。10 分、1, 6, 24 時間後の比較として経時変化を観察したところでは、24 時間後に発現量変化を来す遺伝子の数が多かった。今後の *in vitro* 曝露研究に於いて、経時変化情報が重要でない場合には 24 時間の曝露が好ましいと考えられた。特に、グループ内での構造の類似性の高い hexachlorocyclohexane HCH グループ内では 24 時間後に発現変化を来したトランスクリプトが 212 あった。これらの中には細胞接着・転写制御・シグナルトランスダクション・蛋白分解に機能分類されるものが多く含まれており、HCH 類曝露にたいし細胞が反応分子メカニズムを推察する上で示唆に富む。

### D-7. 転写因子検索ソフト

転写因子検索ソフトを開発し、公開した。これは遺伝子の上流で転写因子結合配列を検索する機能を有する。類似の機能を有するアプリケーションは近年複数見られるが、我々のソフトは Affymetrix 社の GeneChip より得た発現データとの相性がよく、発現データを解析し上流配列の検索を連携良く検索することが可能である。その応用としてレチノイン酸類による細胞刺激後に発現誘導が確認できた遺伝子の上流を検索したところ、レチノイン酸レセプター認識配列が見いだされ、発現実験及び検索ソフトが妥当に機能していると考えられた。

## E. 結論

倫理的監視の元で手術時に得られたヒト組織(腎臓)を使用して、臨床検体を得るシステムを構築することができた。さらに、これらの検体より尿細管細胞を主たる成分とするプライマリーカルチャーを得ることができ、これらの細胞に化学物質を曝露して遺伝子発現解析を行った。

## F. 健康危険情報

特記事項なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Oshima, Y., and Fujimura, A. (2003). Function of a conserved residue in the amino terminal alpha-helix of four helical bundle cytokines. *Cytokine* 24, 36-45.

Oshima, Y., and Fujimura, A. (2003). Analysis of 3'/5' Ratio of Actin and Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH). Universal Academy Press, Inc., Tokyo, Japan.

Oshima, Y., Kurokawa, S., Tokue, A., Mano, H., Saito, K., Suzuki, M., Imai, M., and Fujimura, A. (2003). Primary cell preparation and genome-wide gene expression analysis of human renal tubular cells, Tokyo, Japan.

Oshima, Y., Ueda, M., Yamashita, Y., Choi, Y. L., Ota, J., Ueno, S., Ohki, R., Koinuma, K., Wada, T., Ozawa, K., Fujimura, A., and Mano, H. (2003). DNA microarray analysis of hematopoietic stem cell-like fractions from individuals with the M2 subtype of acute myeloid leukemia. *Leukemia* 17, 1990-7.

Oshima Y, Kurokawa S, Tokue A, Mano H, Saito K, Suzuki M, Imai M, Fujimura A: Primary Cell Preparation of Human Renal Tubular Cells for Transcriptome Analysis: Toxicological Mechanisms and Methods, (2004) Sep/Oct; 14(5): 309-316

Oshima Y, Ishida Y, Shinohara A, Mano H, Fujimura A: Expression Profiling of Gene with Upstream AML1 Recognition Sequence in Hematopoietic Stem Cell-Like Fractions from Individuals with The M2 Subtype of Human Acute Myeloid Leukemia: *Experimental Hematology*, (2004) Jul; 32(suppl): 34 (Abs# 14)

Numata A, Shimoda K, Kamezaki K, Haro T, Kakumitsu H, Shide K, Kato K, Miyamoto T, Yamashita Y, Oshima Y, Nakajima H, Iwama A, Aoki K, Takase K, Gondo H, Mano H, Harada M. Signal transducers and activators of transcription 3 augments the transcriptional activity of CCAAT/ enhancer-binding protein alpha in granulocyte colony-stimulating factor

signaling pathway. *J Biol Chem.* (2005) ;280(13):12621-9.

大島康雄, 藤村昭夫: 日本人組織を用いたトキシコゲノミクス研究: *臨床薬理* 2005年1月号; 36(1): 11-12

### 2. 学会発表

Yasuo Oshima, Shinsuke Kurokawa, Akihiko Tokue, Hiroyuki Mano, Ken Saito, Makoto Suzuki, Masashi Imai, Akio Fujimura; Primary cell preparation and genome-wide gene expression analysis of human renal tubular cells; *Toxicogenomics International Forum* (2003) (Shibuya, Tokyo)

Yasuo Oshima, Akio Fujimura; Analysis of 3'/5' Ratio of Actin and Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH); *Genome Informatics Workshop* (2003) (Yokohama, Kanagawa)

大島康雄, 藤村昭夫: シンポジウム トキシコゲノミクスー現状と臨床薬理学への応用ー 日本人組織を用いたトキシコゲノミクス研究: *臨床薬理学会年会* 2004年9月 静岡

Yasuo Oshima, Yusuke Ishida, Ayumi Shinohara, Hiroyuki Mano, Akio Fujimura.: Expression Profiling of Gene with Upstream AML1 Recognition Sequence in Hematopoietic Stem Cell-Like Fractions from Individuals with The M2 Subtype of Human Acute Myeloid Leukemia: *33rd Annual Meeting of International Society for Experimental Hematology*, Jul (2004), New Orleans, USA

Fujimura A: Recent advances of clinical pharmacology: *Toxicogenomics: Japan-China Joint Meeting Of Basic And Clinical Pharmacology* Sep (2004), Shizuoka, Japan

Fujimura A, Oshima Y: *Toxicogenomics: The 17th Korea-Japan Joint Seminar on Pharmacology*, Oct (2004), Jeonju, Korea

Kishimoto S, Oshima Y, Gamba M, Fujimura A: Cisplatin induced gene expression in primary human renal cortical cell ~ an approach to get rid of cisplatin's nephrotoxicity ~: *Toxicogenomics International Forum 2004*, Oct (2004), Kyoto Japan

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

表 1

曝露試験割付表 1

化合物名	Pre	10min	1hr	6hr	24 h r
Vehicle-1	#8-1	#8-2	#8-3	#8-4	#8-5
Lead acetate (10 $\mu$ M)		#8-6	#8-7	#8-8	#8-9
2,3,7,8-TCDD (10 nM)		#8-10	#8-11	#8-12	#8-13
Cadmium chloride (0.1 $\mu$ M)		#8-14	#8-15	#8-16	#8-17
Thimerosal (50 nM)		#8-18	#8-19	#8-20	#8-21
Vehicle-2	#12-1				
Allyl alcohol (100 $\mu$ M)		#12-2	#12-3	#12-4	#12-5
Ethylene glycol (100 $\mu$ M)		#12-6	#12-7	#12-8	#12-9
Chloroform (100 $\mu$ M)		#12-10	#12-11	#12-12	#12-13
Phenol (100 $\mu$ M)		#12-14	#12-15	#12-16	#12-17
Formaldehyde (100 $\mu$ M)		#12-18	#12-19	#12-20	#12-21
Arsenic trioxide (0.1 $\mu$ M)		#12-22	#12-23	#12-24	#12-25

表 2

曝露試験割付表 2

化合物名	Pre	10min	1hr	6hr	24 h r
Vehicle-3	#13-1				
Arsenic acid (1 $\mu$ M)		#13-2	#13-3	#13-4	#13-5
Arsenic iodide (0.05 $\mu$ M)		#13-6	#13-7	#13-8	#13-9
<i>o</i> -Arsanilic acid (10 $\mu$ M)		#13-10	#13-11	#13-12	#13-13
Cacodylic acid (10 $\mu$ M)		#13-14	#13-15	#13-16	#13-17
Vehicle-4	#14-1				
alpha-HCH (1 $\mu$ M)		#14-2	#14-3	#14-4	#14-5
beta-HCH (1 $\mu$ M)		#14-6	#14-7	#14-8	#14-9
gamma-HCH (1 $\mu$ M)		#14-10	#14-11	#14-12	#14-13
delta-HCH (1 $\mu$ M)		#14-14	#14-15	#14-16	#14-17

表 3

解析分類表

分類名	化合物名
Vehicle	Vehicle-1、 Vehicle-2、 Vehicle-3、 Vehicle-4
Renal Toxicity	Lead acetate, Cadmium chloride, Thimerosal, Allyl alcohol, Ethylene glycol, Chloroform, Phenol, Formaldehyde, Arsenic trioxide, Arsenic iodide, <i>o</i> -Arsanilic acid, Cacodylic acid
Metal compound	Lead acetate, Cadmium chloride, Thimerosal, Arsenic trioxide, Arsenic acid, Arsenic iodide, <i>o</i> -Arsanilic acid, Cacodylic acid
Arsenic compound	Arsenic trioxide, Arsenic acid, Arsenic iodide, <i>o</i> -Arsanilic acid, Cacodylic acid
HCH compound	alpha-HCH, beta-HCH, gamma-HCH, delta-HCH

表4 ボルケーノプロットへ与えたパラメータ1

解析方法

1. Renal Toxicity

1) data割付

Renal Toxicityなし : 分類表のVehicleすべて、時間は0と設定

Renal Toxicityあり : 分類表のRenal Toxicity、時間は各曝露時間に対応

2) Normalization

a) Data Transformation : Set measurement less than 0.01 to 0.01

b) PerChip:Normalize to positive control genes : better-HK

c) PerGene:Normalize to specific samples : Vehicleすべて

3) Filter on Flags

value must appear at least 35 out of samples → 17624 genes

4) Volcano Plot -2Conditions- color

First Condition : Renal Toxicityあり

Second Condition : Renal Toxicityなし

Group Specification : Renal Toxicity

P-value Cutoff : 0.05

Fold Difference : 2

表5 ボルケーノプロットへ与えたパラメータ2

4

解析方法

2. Metal compound

1) data割付

Metal compoundなし : 分類表のVehicleすべて、時間は0と設定

Metal compoundあり : 分類表のMetal compound、時間は各曝露時間に対応

2) Normalization

a) Data Transformation : Set measurement less than 0.01 to 0.01

b) PerChip:Normalize to positive control genes : better-HK

c) PerGene:Normalize to specific samples : Vehicleすべて

3) Filter on Flags

value must appear at least 22 out of samples → 17918 genes

4) Volcano Plot -2Conditions- color

First Condition : Metal compoundあり

Second Condition : Metal compoundなし

Group Specification : Metal compound

P-value Cutoff : 0.05

Fold Difference : 2

5

表6 ボルケーノプロットへ与えたパラメータ 3

解析方法

3. Arsenic compound

1) data割付

- Arsenic compoundなし : 分類表のVehicleすべて、時間は0と設定
- Arsenic compoundあり : 分類表のArsenic compound、時間は各曝露時間に対応

2) Normalization

- a) Data Transformation : Set measurement less than 0.01 to 0.01
- b) PerChip:Normalize to positive control genes : better-HK
- c) PerGene:Normalize to specific samples : Vehicleすべて

3) Filter on Flags

value must appear at least 16 out of samples → 17825 genes

4) Volcano Plot -2Conditions- color

- First Condition : Arsenic compoundあり
- Second Condition : Arsenic compoundなし
- Group Specification : Arsenic compound
- P-value Cutoff : 0.05
- Fold Difference : 2

表7 ボルケーノプロットへ与えたパラメータ 4

解析方法

4. HCH compound

1) data割付

- HCH compoundなし : 分類表のVehicleすべて、時間は0と設定
- HCH compoundあり : 分類表のHCH compound、時間は各曝露時間に対応

2) Normalization

- a) Data Transformation : Set measurement less than 0.01 to 0.01
- b) PerChip:Normalize to positive control genes : better-HK
- c) PerGene:Normalize to specific samples : Vehicleすべて

3) Filter on Flags

value must appear at least 12 out of samples → 17565 genes

4) Volcano Plot -2Conditions- color

- First Condition : HCH compoundあり
- Second Condition : HCH compoundなし
- Group Specification : HCH compound
- P-value Cutoff : 0.05
- Fold Difference : 2

表 8 set1 に含まれる遺伝子

Set1に含まれる遺伝子

Gene symbol	GO Biological Process Description	GO Molecular Function Description
IPO7	protein-nucleus import, docking, signal transduction, protein transport	small GTPase regulatory/interacting protein activity RAN protein binding, protein transporter activity
CTGF	regulation of cell growth, DNA metabolism, cell motility cell adhesion, epidermis development, response to wounding	protein binding, insulin-like growth factor binding heparin binding
MYST4	nucleosome assembly, regulation of transcription, DNA-dependent negative regulation of transcription, histone acetylation positive regulation of transcription	DNA binding, histone acetyltransferase activity, transcriptional activator activity transcriptional repressor activity, transferase activity
DLST	generation of precursor metabolites and energy tricarboxylic acid cycle, metabolism	dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase activity acyltransferase activity, transferase activity
CPM	proteolysis and peptidolysis aromatic compound metabolism, morphogenesis	carboxypeptidase A activity, ferric iron binding metallopeptidase activity, hydrolase activity
KIAA2025	protein ubiquitination	nucleic acid binding, ubiquitin-protein ligase activity zinc ion binding
MRPL43		structural constituent of ribosome

表 9 set 2 に含まれる遺伝子-1

Set2に含まれる遺伝子

Gene symbol	GO Biological Process Description	GO Molecular Function Description
FLJ10849 (SEPT11)	cytokinesis, cell cycle	GTP binding
HMOX1	heme oxidation positive regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade stress response	heme oxygenase (decyclizing) activity signal transducer activity, oxidoreductase activity
CLTB	intracellular protein transport	calcium ion binding
APIS1	intracellular protein transport, receptor mediated endocytosis	protein binding, protein transporter activity
GSR	electron transport, glutathione metabolism response to pest, pathogen or parasite	glutathione-disulfide reductase activity disulfide oxidoreductase activity, FAD binding
MAPK1	protein amino acid phosphorylation, induction of apoptosis chemotaxis, response to stress, cell cycle signal transduction, synaptic transmission	protein serine/threonine kinase activity, MAP kinase activity protein-tyrosine kinase activity, ATP binding, transferase activity
Gene symbol	GO Biological Process Description	GO Molecular Function Description
BAX	apoptosis, induction of apoptosis, germ cell development induction of apoptosis by extracellular signals, negative regulation of survival gene product activityapoptotic mitochondrial changes, regulation of apoptosis, negative regulation of cell cycle	
FHL1	muscle development, cell growth, cell differentiation	zinc ion binding
MYO6	striated muscle contraction perception of sound	motor activity, actin binding, calmodulin binding ATP binding, structural constituent of muscle
FGFR1	MAPKKK cascade, skeletal development, protein amino acid phosphorylation fibroblast growth factor receptor signaling pathway	protein serine/threonine kinase activity, protein-tyrosine kinase activity, receptor activity, fibroblast growth factor receptor activity ATP binding, heparin binding, transferase activity
H41	cell proliferation	
FHL1	muscle development, cell growth, cell differentiation	zinc ion binding

表 10 set2 に含まれる遺伝子-2

Set2に含まれる遺伝子

Gene symbol	GO Biological Process Description	GO Molecular Function Description
ROD1	nuclear mRNA splicing, via spliceosome, mRNA processing, morphogenesis	nucleic acid binding, RNA binding
FN1	acute-phase response, cell adhesion, metabolism response to wounding, cell migration	extracellular matrix structural constituent, collagen binding heparin binding, oxidoreductase activity
Sep6	protein complex assembly receptor mediated endocytosis	phospholipid binding, phosphatidylinositol binding clathrin binding
FLJ20986	cation transport metabolism	magnesium ion binding, ATP binding ATPase activity, coupled to transmembrane movement of ions, phosphorylative mechanism, hydrolase activity, acting on acid anhydrides, catalyzing transmembrane movement of substances ATPase activity
CLIC4	ion transport, chloride transport, apoptosis	voltage-gated chloride channel activity
LOC51762	small GTPase mediated signal transduction, protein transport	GTPase activity, GTP binding

表 11 set 3 に含まれる遺伝子

Set3に含まれる遺伝子

Gene symbol	GO Biological Process Description	GO Molecular Function Description
TAF15		single-stranded DNA binding, RNA polymerase II transcription factor activity single-stranded RNA binding, zinc ion binding
LIM	heart development	actin binding, protein kinase C binding protein binding, receptor signaling complex scaffold activity actinin binding
KIAA1361	protein serine/threonine kinase activity, ATP binding transferase activity	
SOX18	regulation of transcription from Pol II promoter	DNA binding RNA polymerase II transcription factor activity

表 12 set 4 に含まれる遺伝子

Set4に含まれる遺伝子

Gene symbol	GO Biological Process Description	GO Molecular Function Description
PIK4CB		1-phosphatidylinositol 4-kinase activity kinase activity, transferase activity phosphotransferase activity, alcohol group as acceptor
ACRV1	developmet	
NFIB	DNA replication, transcription regulation of transcription, DNA-dependent	transcription factor activity
TEAD1	regulation of transcription, DNA-dependent	transcription factor activity
SLAC2-B	intracellular protein transport	protein binding, Rab interactor activity
DDX26		helicase activity, transmembrane receptor activity
PLEKHA1		phospholipid binding
SNX27	intracellular signaling cascade	protein binding



表 13 number of gene that significantly up/down-regulated genes

The number of gene significantly regulated by volcano analysis

Group	ExposureTime	Up-regulation	Down-regulation	Total
Renal Toxicity	10min	0	1	1
	1hr	0	8	8
	6hr	0	5	5
	24hr	0	1	1
Metal compound	10min	0	1	1
	1hr	0	5	5
	6hr	1	0	1
	24hr	3	2	5
Arsenic compound	10min	8	4	12
	1hr	3	9	12
	6hr	10	13	23
	24hr	16	5	21
HCH compound	10min	25	16	41
	1hr	29	34	63
	6hr	115	63	178
	24hr	118	94	212

8

表 14 Annotation List of "Renal Toxicity" group

Annotation List of "Renal Toxicity" group

Regulation type	Exposure Time	Gene Symbol	Gene Title	Biological Process
Up-regulation	10min			
	1hr			
	6hr			
	24hr			
Down-regulation	10min	MALAT1	metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (non-coding RNA)	
	1hr	MALAT1	metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (non-coding RNA)	
		STK4	serine/threonine kinase 4	protein amino acid phosphorylation, apoptosis signal transduction, protein kinase cascade
		CBL	Cas-B $\gamma$ -M (murine) ecotropic retroviral transforming sequence	cell surface receptor linked signal transduction, epidermal growth factor receptor signaling pathway, protein ubiquitination, positive regulation of receptor mediated endocytosis
	6hr	KIAA1033	KIAA1033	
		KIAA0674	KIAA0674	protein folding
MALAT1		metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (non-coding RNA)		
	CYP1B1	cytochrome P450	ee development (sensu Mammalia), electron transport, visual perception	
24hr	CCDC18	coiled-coil domain containing 18		

10

表 15 Annotation List of "Metal" group

Annotation List of "Metal" group

Regulation type	Exposure Time	Gene Symbol	Gene Title	Biological Process
Up-regulation	10min			
	1hr	FLJ10038	hypothetical protein FLJ10038	
	6hr	CIRBP	cold inducible RNA binding protein	response to cold
	24hr	CIRBP	cold inducible RNA binding protein	response to cold
	-	C16orf44 clone SYN00419	chromosome 16 open reading frame 44 CDNA FLJ26120 fis	
Down-regulation	10min	STK4	serine/threonine kinase 4	protein amino acid phosphorylation, apoptosis signal transduction, protein kinase cascade cell surface receptor linked signal transduction positive regulation of apoptosis
	1hr	CBL	Cas-Dr-M (murine) ecotropic retroviral transforming sequence	cell surface receptor linked signal transduction epidermal growth factor receptor signaling pathway protein ubiquitination positive regulation of receptor mediated endocytosis
		MALAT1	metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (non-coding RNA)	
		LOC440118	LOC440118	
	6hr			
	24hr	FLJ35740 CCDC18	Ankyrin repeat domain 18A coiled-coil domain containing 18	

表 16 Annotation List of "Arsenic compound" group

Annotation List of "Arsenic compound" group

Regulation type	Exposure Time	Gene Symbol	Gene Title	Biological Process
Up-regulation	10min	member 3	solute carrier family 22 (extraneuronal monoamine transporter)	ion transport, organic cation transport
		ZNF623	zinc finger protein 623	transcription, regulation of transcription
		F2RL2	coagulation factor II (thrombin) receptor-like 2	signal transduction G-protein coupled receptor protein signaling pathway blood coagulation, response to wounding
		type VIII	collagen	phosphate transport, cell adhesion
		C3H type-like 1	zinc finger protein 36	
		class II	major histocompatibility complex	immune response, antigen presentation antigen processing, exogenous antigen via MHC class II
		LOC91614	novel 58.3 KDA protein	intracellular signaling cascade
	C16orf44	chromosome 16 open reading frame 44		
	1hr	F2RL2	coagulation factor II (thrombin) receptor-like 2	signal transduction G-protein coupled receptor protein signaling pathway blood coagulation, response to wounding
		member 3	solute carrier family 22 (extraneuronal monoamine transporter)	ion transport, organic cation transport
CALR		calreticulin	regulation of transcription, protein folding protein-nucleus export, calcium ion homeostasis	

表 17 Annotation List of "Arsenic compound" group

Annotation List of "Arsenic compound" group

Regulation type	Exposure Time	Gene Symbol	Gene Title	Biological Process
Up-regulation	6hr	SRP68	signal recognition particle 68kDa	
		PRO1853	hypothetical protein PRO1853	
		type VIII	collagen	phosphate transport, cell adhesion
		ZNF623	zinc finger protein 623	transcription, regulation of transcription
		CIRBP	cold inducible RNA binding protein	response to cold, lipoprotein metabolism
		APOL6	apolipoprotein L6	lipid transport
		<i>C16orf44</i>	<i>chromosome 16 open reading frame 44</i>	
		member 3	solute carrier family 22 (extracranial monoamine transporter)	ion transport, organic cation transport

表 18 Annotation List of "Arsenic compound" group

Annotation List of "Arsenic compound" group

Regulation type	Exposure Time	Gene Symbol	Gene Title	Biological Process
Up-regulation	24hr	C3H type-like 1	zinc finger protein 36	
		PRO1853	hypothetical protein PRO1853	
		<i>C16orf44</i>	<i>chromosome 16 open reading frame 44</i>	
		type VIII	collagen	phosphate transport, cell adhesion
		MGC10946	Hypothetical protein MGC10946	
		F2RL2	coagulation factor II (thrombin) receptor-like 2	signal transduction G-protein coupled receptor protein signaling pathway response to wounding, blood coagulation
		class II	major histocompatibility complex	immune response, antigen presentation, exogenous antigen, antigen processing exogenous antigen via MHC class II
		<i>C20orf149</i>	<i>chromosome 20 open reading frame 149</i>	
		member 3	solute carrier family 22	ion transport, organic cation transport
		CIRBP	cold inducible RNA binding protein	response to cold
		group F	nuclear receptor subfamily 2	transcription regulation of transcription from RNA polymerase II promoter, lipid metabolism, signal transduction
		type XXVII	Collagen	phosphate transport, cell adhesion
		Sep9	septin 9	
		CSF1	colony stimulating factor 1 (macrophage)	cell proliferation, positive regulation of cell proliferation hemopoiesis, cell differentiation, macrophage differentiation
		ZNF623	zinc finger protein 623	transcription, regulation of transcription
		NFIC	Nuclear factor I/C (CCAAT-binding transcription factor)	DNA replication, transcription, , regulation of transcription transcription from RNA polymerase II promoter

表 19 Annotation List of "Arsenic compound" group

Annotation List of "Arsenic compound" group						
Regulation type	Exposure Time	Gene Symbol	Gene Title	Biological Process		
Down-regulation	6hr	FCRL4	Fe receptor-like 4 // Fe receptor-like 4			
		FLJ43505	FLJ43505 protein			
		EMP1	epithelial membrane protein 1	development, cell proliferation, cell death epidermis development, cell growth		
		KIAA2002	KIAA2002 protein	protein amino acid phosphorylation		
		family 1	cytochrome P450	eye development (sensu Mammalia), electron transport visual perception		
		MAP3K8	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8	protein amino acid phosphorylation		
		beta 5	Integrin	cell-matrix adhesion, development integrin-mediated signaling pathway		
		ENC1	ectodermal-neural cortex (with BTB-like domain)	development, neurogenesis		
		PTGER4	prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4)	immune response, signal transduction G-protein coupled receptor protein signaling pathway G-protein signaling coupled to cAMP nucleotide second messenger		
		LDLR	low density lipoprotein receptor (familial hypercholesterolemia)	O-linked glycosylation, lipid metabolism lipid transport, endocytosis, steroid metabolism cholesterol metabolism		
		KIAA1033	KIAA1033			
		MALAT1	metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1			
			24hr	FLJ35740	Ankyrin repeat domain 18A	
				---	Similar to zinc finger protein 92	
MALAT1	metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1					
USP34	ubiquitin specific protease 34			ubiquitin-dependent protein catabolism		
CCDC18	coiled-coil domain containing 18					

表 20 The number of gene classified by function in "HCH" group at exposure time 24hr  
The number of gene classified by function in "HCH" group at exposure time 24hr

Regulation type	Function	Number of gene
Up-regulation (total 118 genes)	cell adhesion	6
	regulation of transcription	6
	signal transduction	5
	proteolysis and peptidolysis	4
	Transcription	4
	chemotaxis	2
	development	2
	fatty acid biosynthesis	2
	potassium ion transport	2
	carbohydrate metabolism	2
	collagen catabolism	2
Down-regulation (total 94 genes)	cell motility	4
	protein folding	4
	neurogenesis	3
	proteolysis and peptidolysis	3
	regulation of cell cycle	3
	signal transduction	3
	transcription	3
	amino acid metabolism	2
	cell adhesion	2
	immunogenesis	2